

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

INDIREKTE MESSUNG DES SEXUALHORMONBINDENDEN
GLOBULINS MIT DER CON A-METHODE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maria Böck
aus
Kaufbeuren
Jahr
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O.A. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen
Prüfung: 20.05.86

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. METHODIK</u>	3
2.1. Material	4
2.1.1. Reagenzien	4
2.1.2. Geräte und anderes Material	4
2.2. Indirekte Messung des SHBG durch die Con A-Methode	5
2.2.1. Prinzip der Con A-Methode	5
2.2.2. Vorversuche zur Con A-Methode	6
2.2.2.1. Messung der Proben	6
2.2.2.2. Variation der Mengenverhältnisse der Reagenzien	8
2.2.2.3. Adsorptionskinetiken	12
2.2.2.4. Variable Gesamtaktivität	14
2.2.2.5. Einfluß von Serumalbumin und von verschiedenen Androgenspiegeln	15
2.2.2.6. Verminderung der unspezifischen Bindung	17
2.2.2.7. Endgültige Con A-Methode	17
2.2.2.8. Berechnung des SHBG-Index	18
2.2.3. Scatchard Plot	18
2.2.3.1. Prinzip und Herleitung und Auswertung des Scatchard Plots	18
2.2.3.2. Der diskordante Tracer	21

	<u>Seite</u>
2.2.3.3. Vorversuche	21
2.2.3.3.1. Durchführung des Scatchard Plots	21
2.2.3.3.2. Einfluß verschiedener Versuchsbedingungen	22
2.2.3.3.3. Variation der SHBG-Konzentration	25
2.2.3.3.4. Vergleich von Versuchen mit konkordantem und diskordantem Tracer	26
<u>3. ERGEBNISSE</u>	27
3.1. SHBG-Index	27
3.1.1. Qualitätskontrolle	27
3.1.2. Klinische Ergebnisse	28
3.1.2.1. Normalkollektiv	28
3.1.2.2. Patienten	30
3.2. Scatchard Plot	34
3.2.1. Assoziationskonstante und Bindungskapazität für DHT und andere Steroide	34
3.2.2. SHBG-Assoziationskonstanten bei verschiedenen Patienten	36
<u>4. DISKUSSION</u>	37
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	44
<u>6. LITERATUR</u>	46

ABKÜRZUNGEN

CBG	Cortisolbindendes Globulin
Con A	Concanavalin A, gebunden an Sepharose 4 B
cpm	counts per minute = Zählraten pro Minute
DEAE	Diethylaminoethanol
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
^3H	Tritium
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
^{125}J	Radioaktives Jod mit der Massenzahl 125
K_{ASS} oder K	Assoziationskonstante
keV	Kiloelektronenvolt
M	molar
NaCl	Natriumchlorid
17-OH-Progesteron	17 α -Hydroxyprogesteron
RIA	Radioimmunoassay
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
Tris	Tris-hydroxy-methyl-amino-methan
U/min.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
$\bar{x}$	Mittelwert

1. EINLEITUNG

Sexualhormone sind im Plasma an Proteine gebunden (15). Solche sexualhormonbindenden Proteine sind Albumin, Orosomucoid, cortisolbindendes Globulin (CBG) und sexualhormonbindendes Globulin (SHBG). Die wichtigsten sind Albumin und SHBG: Das SHBG hat eine hohe Affinität bei niedriger Kapazität für 17 β -Hydroxy-Steroide (17), besonders 5 α -Dihydrotestosteron (DHT), Testosteron und für Östradiol in der Reihenfolge ihrer Affinität, Albumin hat für diese Steroide dagegen eine hohe Kapazität, aber niedrige Affinität.

Die Verteilung der Androgenbindung an die verschiedenen Plasmaproteine soll folgende Tabelle veranschaulichen:

Tab. 1: Verteilung der Androgenbindung an Plasmaproteine (30)

	Männer	Frauen	Schwangere
SHBG	58 %	81,1 %	97,0 %
Albumin	38 %	18,0 %	2,8 %
CBG	2-3 %		
frei	1-2 %	0,9 %	0,2 %

Das wichtigste Bindungsprotein für die Sexualhormone ist also das SHBG. Seine Aufgaben sind im einzelnen noch nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Autoren nennen z.B.:

- Schutz der gebundenen Hormone vor Inaktivierung und damit Verlängerung der biologischen Halbwertszeit (16).
- Die "Balance", d.h. die Regulation des Mengenverhältnisses der freien Sexualhormone zueinander; es verändert sich durch eine Änderung des SHBG-Spiegels ("servo amplifizierende Funktion" 1, 16): Bei Erhöhung des SHBG-Spiegels verschiebt sich die Bindung von DHT und Testosteron zugunsten von DHT und die von Testosteron und Östradiol zugunsten von Testosteron, umgekehrt bei Erniedrigung des SHBG.
- Ausgleich von schnellen Schwankungen des Hormonspiegels (16).

Das SHBG ist ein β -Globulin mit einem Molekulargewicht etwa um 100.000 (2,18). Es ist noch nicht ganz geklärt, ob es als Dimer (5) oder - wahrscheinlicher - als Tetramer (12) vorliegt. Die Bildung des SHBG in der Leber wird induziert durch hohe Östrogenspiegel (21), hohe Androgenspiegel dagegen hemmen seine Bildung.

Der Radioimmunoassay für das SHBG eignet sich noch nicht zur routinemäßigen Anwendung wegen der schwierigen und aufwendigen Reinigung bzw. Isolierung des SHBG (28). Bei der Messung des SHBG ist man deshalb häufig auf indirekte Methoden angewiesen. Deren Prinzip besteht darin, daß an das SHBG gebundene Androgene bestimmt werden, wobei 1 Mol der gebundenen Androgene 1 Mol SHBG entspricht.

Dazu wird ein tritiummarkiertes Hormon hoher Affinität (^3H -DHT oder ^3H -Testosteron) an das SHBG gebunden, worauf dann durch verschiedene Methoden - wie z.B. Gleichgewichtsdialyse (8,32), Elektrophorese (4,14), Fällung mit Aktivkohle (10,24), Ammonium-Sulfat-Präzipitation (23) oder Chromatographie (2,9) - der SHBG-gebundene Hormonanteil vom ungebundenen getrennt wird.

Das Ziel dieser Arbeit war nun, mit Hilfe einer chromatographischen Methode, nämlich der Adsorption von SHBG an Con A-Sepharose, indirekt das Serum-SHBG bei verschiedenen Patientenkollektiven zu bestimmen.

2. METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Radioaktiv markierte Steroide (von Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig):

^3H - 5α -Dihydrotestosteron

^3H - Testosteron

^3H - Androstendion

^3H - Dehydroepiandrosteron

^3H - 17α -Hydroxyprogesteron

^3H - Östradiol

Nicht radioaktiv markierte Steroide (von Firma Merck,
Darmstadt):

5 α -Dihydrotestosteron
Testosteron
Androstendion
Dehydroepiandrosteron
17 α -Hydroxyprogesteron
Östradiol
Cortisol

Andere Reagenzien:

Humanalbumin, 4 %ige Lösung
Con A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, mit 0,15 M NaCl
(8,76 g/l) und einer Spatelspitze
Natriumazid als Bakteriostatikum
Norit A (Aktivkohle); zu dessen Filtration
Schleicher and Schullpaper Nr. 595

2.1.2. Geräte und anderes Material

Eppendorf-Pipetten, Multipipette
Dispensette (Firma Brand, Wertheim)
Evaporator
Vortex Mixer
Zentrifuge
Wasserstrahlpumpe
Magnetrührer

Beta-Szintillationszähler: Tri-Carb Liquid-Scintillation

Spectrometer System Modell 3324 der Fa. Packard,
Illinois, USA

Lochstreifenausdruck am Spectrometer: Teletype ASR 33

Die Proben wurden in Snap Cap Bio-Vial (4 ml) der Firma Beckmann angesetzt, zur Zählung mit Unisolve-Szintillationsgemisch (Fa. Zinsser, Frankfurt) versetzt und in die für das Spectrometer passenden Zinsser-Zählröhrchen 714 gestellt.

2.2. Indirekte Messung des SHBG durch die Con A-Methode

2.2.1. Prinzip der Con A-Methode

Das zu messende Serum wird mit einem radioaktiv markierten Hormon mit hoher Affinität zum SHBG (in unserem Fall ^3H -DHT) inkubiert. Da allerdings das DHT nicht nur an das SHBG, sondern auch - mit geringerer Affinität - an CBG bindet, wird letzteres durch einen Überschuß an Cortisol, das zum CBG eine höhere Affinität hat als DHT, abgesättigt.

Die Abtrennung des SHBG-gebundenen ^3H -DHT vom freien und an andere Proteine gebundenen erfolgt durch Adsorption des SHBG an Con A-Sepharose, die durch Zentrifugieren sedimentiert werden kann (19).

Con A-Sepharose besteht aus Concanavalin A, das durch Bromcyan kovalent an Sepharose 4 B gebunden ist. Der aktive Teil dieser Verbindung ist das Concanavalin A, ein Metalloprotein, das Mn^{++} enthält. Es kann spezifisch Zucker, Polysaccharide und Glykoproteine, die die C_3 -, C_4 - und C_6 -Hydroxylgruppen der α -D-Mannopyra-

nose, der α -D-Glukopyranose oder der β -D-Fructofuranose enthalten, binden (8, 22). Das SHBG hat einen solchen Kohlenhydratanteil, der an Concanavalin A bindet. Die Verbindung aus Concanavalin A und Sepharose 4 B ergibt in Wasser ein feinkörniges, unlösliches Gel, das durch Zentrifugieren oder auch einfaches Stehenlassen sedimentiert werden kann (8).

Im folgenden wird die Con A-Methode und ihre Optimierung ausführlich beschrieben.

2.2.2. Vorversuche zur Con A-Methode

2.2.2.1. Messung der Proben

Zur radioaktiven Markierung von Stoffen können Radionuklide verwendet werden, die Radioaktivität in Form von β -Strahlung (z.B. Tritium) oder γ -Strahlung (z.B. ^{125}J) freisetzen.

Die γ -Strahlung in Form elektromagnetischer Wellen regt einen Szintillationskristall an, von dem aus die Strahlungsenergie in elektrische Energie umgewandelt wird. Sie wird verstärkt und kann dann in Form elektrischer Impulse gezählt werden.

Im Gegensatz dazu ist die β -Strahlung - z.B. von Tritium - nicht energiereich (18,6 keV) genug, einen Kristall direkt anzuregen. Zu dem β -Strahler wird deshalb eine Szintillationsflüssigkeit zugegeben, in der die β -Strahlen ein Leuchten erzeugen, das

wiederum von Photomultipliern aufgefangen und in elektrische Impulse umgewandelt wird.

Die β -Szintillationszählung mit Tritium ist relativ aufwendig im Vergleich zur γ -Messung mit ^{125}J , da die Szintillationsflüssigkeit zugegeben werden muß, was zusätzlichen Arbeitsaufwand (Zugabe zur Probe, Mischen der Proben) und zusätzliche Kosten (die Flüssigkeit ist teuer) bedeutet. Die Markierung mit dem γ -Strahler ^{125}J ist für Steroide aber nicht brauchbar, da dazu eine phenolische Aminosäure benötigt wird, die die Steroide (außer Östrogen) nicht besitzen. Man müßte eine solche Gruppe zusätzlich einführen; dies würde aber die chemischen Eigenschaften der Steroide verändern.

Fehlerquellen bei der Messung:

Ist die Konzentration oder die Menge des Tracers im Verhältnis zur zugegebenen Menge an Szintillationsflüssigkeit zu groß, so kann es zu erheblichen Abweichungen der Meßgenauigkeit kommen. Wenn z.B. zur Messung der Gesamtaktivität der Probe die 3 ml Szintillationsflüssigkeit zu 1 ml Tracer zugegeben wurden (das Probenvolumen beträgt normalerweise ca. 200 μl), so wurde eine zu niedrige Aktivität gemessen. Die Zählausbeute bei dieser Messung konnte um ca. 1/3 erhöht werden, wenn der Tracer zuerst lyophilisiert, das Lyophilisat in 100 μl Phosphat-Puffer wieder gelöst und dann erst die Szintillationsflüssigkeit zugegeben wurde.

Durchführung der Probenmessung:

Die Proben werden in Szintillations-Röhrchen angesetzt, denen dann ohne Umfüllen direkt mit der Dispensette 3 ml Unisolve-Szintillationsflüssigkeit zugefügt wird. Die Röhrchen werden verschlossen und durch gründliches Schütteln auf dem Vortex-Mixer gut durchmischt, dann kurze Zeit bei 4°C gekühlt. Gezählt wird 1 Minute in einem Szintillationsspektrometer.

2.2.2.2. Variationen der Mengenverhältnisse der Reagenzien

Um die optimalen Mengenverhältnisse des zu messenden Serums zu den zugegebenen Reagenzien zu ermitteln, wurde nacheinander in verschiedenen Versuchen jeweils ein Mengenparameter verändert, während die anderen konstant gehalten wurden; ausgegangen wurde dabei von 100 µl Serum, 300 µl Con A, 0,25 µg Cortisol und 1 ml ³H-DHT-Tracer mit ca. 8.000 cpm/ml.

Zur Variation der Serummenge wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, ausgehend von 200 µl Serum = 1/1 Verdünnung; alle anderen Versuchsparameter wurden konstant gehalten. Es wurde jeweils ein Serum einer männlichen und einer weiblichen Normalperson sowie ein Poolserum von Schwangeren verwendet.

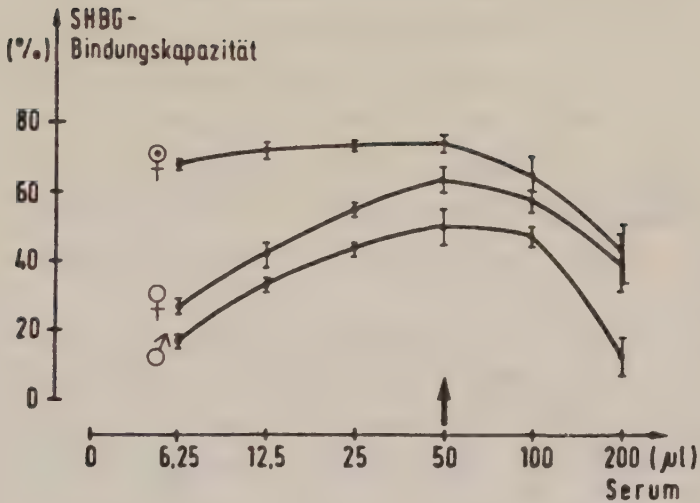


Abb. 1: Variation der Serummenge

(⊙ = Schwangere, ♀ = Frau, ♂ = Mann)

Aus Abb. 1 ist zu ersehen, daß bei Einsatz von 50 µl Serum in die Probe der größte Anteil des Tracers gebunden wird. Ausnahme ist das Schwangerenserum, bei dem die prozentuale Bindung auch bei kleineren Serumengen noch nicht absinkt. Die Tatsache, daß bei Zugabe einer grösseren Menge an Serum die prozentuale Tracerbindung kleiner wird, ist dadurch zu erklären, daß in diesem Fall die Bindungskapazität der Con A-Sepharose überschritten wird und ein Teil des SHBG ungebunden bleibt, der dann nicht im Sediment erscheint.

Zur Variation der Con A-Menge wurden im Versuch Con A-Mengen zwischen 50 und 1000 μl /Probe mit 100 μl Serum eingesetzt (Abb. 2).

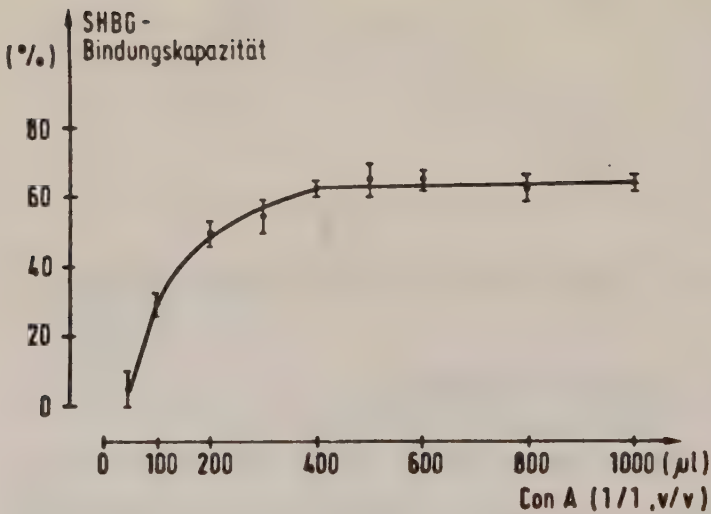


Abb. 2: Variation der Con A-Menge

Aus den Abbildungen 1 und 2 ist zu entnehmen, daß die Menge von 300 μl Con A bei 50 μl Serum im "sicheren" Bereich liegt. Die Entscheidung, die Serummenge zu halbieren und nicht die Con A Menge zu verdoppeln, beruhte einerseits darauf, daß das Con A-Gel teuer ist, andererseits kommt man mit kleineren Mengen an Serum aus.

Der folgende Versuch sollte zeigen, welchen Einfluß Cortisol in der Probe auf die prozentuale Tracerbindung hat. Durch Bindung des ^3H -DHT-Tracers an CBG im Serum entstünde z.B. ein falsch erhöhter SHBG-Index, da auch CBG an Con A adsorbiert wird; dem sollte durch Absättigung des CBG durch Cortisol, das eine höhere Affinität zum CBG hat als das DHT, entgegengewirkt werden. Durch Verdrängung des ^3H -DHT an SHBG durch größere Mengen Cortisol andererseits entstünde ein falscher niedriger Index.

Aus Abb. 3 ist zu ersehen, daß Mengen bis zu $2\text{ }\mu\text{g}$ Cortisol in der Probe keine Unterschiede im Ergebnis verursachen; erst ein Cortisolüberschuß von mehr als $2\text{ }\mu\text{g}$ in der Probe (also in $100\text{ }\mu\text{l}$ Serum) verursacht einen Abfall der Tracerbindung, verdrängt also Cortisol das ^3H -DHT am SHBG. Die Menge von $0,2\text{ }\mu\text{g}$ Cortisol gaben wir, wie beschrieben (19), aus theoretischen Überlegungen heraus weiterhin zu.

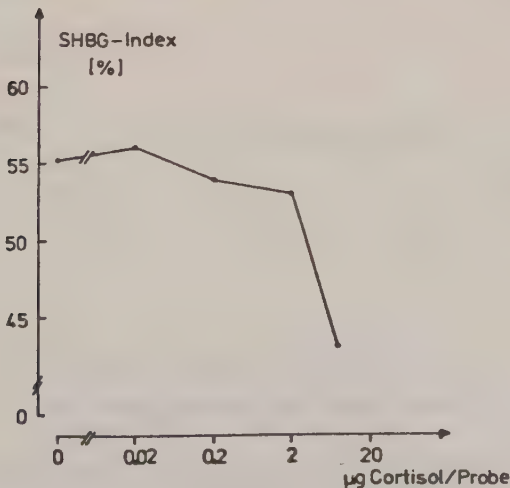


Abb. 3: Variation der Cortisolmenge

2.2.2.3. Adsorptionskinetiken

Die Adsorptionskinetik von Serum-SHBG an Con A (= Con A-Kinetik) und von Tracer an den SHBG-Con A-Komplex (=Tracerkinetik) sollte zweierlei zeigen:

1. Die Inkubationszeit, bei der die Tracerbindung am höchsten ist.
2. Den Einfluß einer Abweichung von der festgesetzten Inkubationszeit auf das Ergebnis bzw. ein evtl. Plateau in der Tracerkinetik.

Bei der Con A-Kinetik wurde die Inkubationszeit in 5- Minuten-Schritten variiert und die Tracer-Inkubationszeit bei 2 Stunden konstant gehalten.

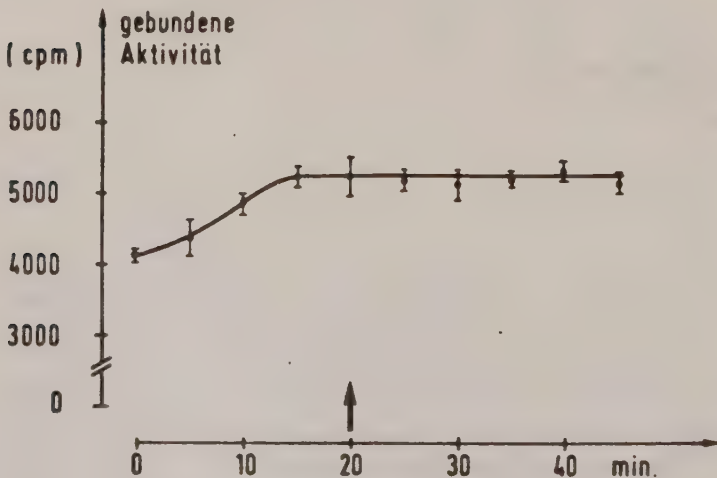


Abb. 4: Kinetik der Inkubation von Serum mit Con A
bei konstanter Tracerinkubationszeit

Abb. 4 zeigt, daß bei Inkubationszeiten zwischen 15 und 45 Minuten die prozentuale Tracerbindung gleich bleibt.

Bei der Tracerkinetik wurde die Inkubationszeit in 15-Minuten-Schritten variiert und die Con A-Inkubation bei 20 Minuten konstant gehalten: Von 45 Minuten Inkubationszeit an aufwärts ergaben sich auch hier keine Änderungen der Tracerbindung mehr (Abb. 5).

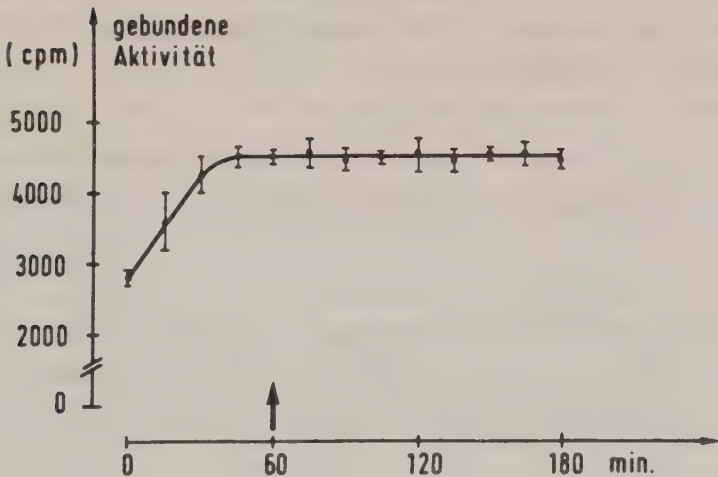


Abb. 5: Kinetik der Tracerinkubation

bei konstanter Con A-Inkubationszeit

Eine Inkubationszeit von 20 Minuten für Serum Con A und eine von 60 Minuten für Con A-Tracer liegt also in einem optimalen Bereich.

2.2.2.4. Variable Gesamtaktivität

Im Verlauf dieser Versuche mußte mehrmals neuer Tracer angesetzt (d.h. von der hohen Konzentration des gekauften auf eine brauchbare Konzentration verdünnt) werden. Da die genaue Einstellung auf eine bestimmte Countzahl schwierig ist, mußte untersucht werden, ob eine Konzentrationsänderung des Tracers einen Einfluß auf die prozentuale Tracerbindung hat.

Dieser Versuch (Abb. 6) zeigt, daß bei Gesamtaktivitäten mit mehr als 15.000 cpm (= 0,04 ng DHT/ml) die prozentuale Bindung kleiner wird, bei kleineren Gesamtaktivitäten jedoch konstant bleibt. Da wir einen Tracer mit ca. 8.000 cpm benutzten, befanden wir uns damit in einem sicheren Bereich.

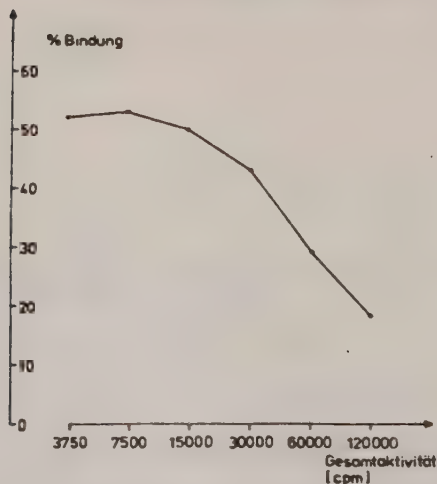


Abb. 6: Variation der Gesamtaktivität

von 3.600 bis 120.000 cpm

2.2.2.5. Einfluß von Serumalbumin und von verschiedenen Androgenspiegeln

Albumin

Das SHBG ist zwar das Protein, das DHT mit der weitaus größten Affinität bindet, das Serumalbumin hat jedoch bei sehr geringer Affinität eine große Kapazität; deshalb mußte geprüft werden, ob das im Serum vorhandene Albumin einen Einfluß auf den SHBG-Index besitzt. Zweimaliges Waschen des Serum-Con A-Gemisches nach seiner Inkubation entfernt nach Nisula (19) das endogene Serumalbumin und andere Serumproteine, während die Glykoproteine - an Con A adsorbiert - im Sediment verbleiben. Dazu wurde das Serum-Con A-Gemisch, wie gewöhnlich, 20 Minuten inkubiert, dann wurden 2 ml PO_4 -Puffer zur Probe zugegeben, diese gut gemischt, 10 Minuten zentrifugiert, der Oberstand abgesaugt und verworfen. Diese Waschprozedur wurde wiederholt und der Versuch dann wie gewohnt fortgesetzt.

Dieser Versuch ergab, daß die prozentuale Tracerbindung des Serums nach Auswaschen des Albumins um 6-9 % höher lag. Wegen des erheblichen Arbeitsaufwandes wurde aber dennoch auf diesen Waschschritt verzichtet.

Endogene Steroide

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß der endogene Steroidhormonspiegel des Serums einen Einfluß auf die Messung des SHBG-Indexes hat, wurden aus dem Serum die endogenen Steroide entfernt.

Zwei Möglichkeiten zur Entfernung der endogenen Steroide wurden geprüft: Nach Heyns et al. (10) und nach Rudd et al. (4). Zu diesem Zweck wurde Serum mit DHT-Tracer versetzt (ca. 4.300 cpm/100 µl) und über Nacht inkubiert. Je ein Teil des Serums wurde nach einer der beiden Methoden behandelt und danach bei je einem Aliquot von 100 µl der SHBG-Index gemessen.

1) Methode nach Heyns et al. (10)

Die Plasmaproben werden nach Zusatz von 50 mg/ml Norit A (= Charcoal) 30 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird die Aktivkohle durch Zentrifugieren (10 min. bei 4000 U/min), Filtrieren über Filterpapier (siehe Materialliste) und nochmaliges Zentrifugieren entfernt. Aus dem Anteil der im Plasma verbliebenen Radioaktivität kann der Anteil des proteingebundenen Testosterons oder DHT errechnet werden.

2) Methode nach Rudd et al. (4)

Zu 100 ml Phosphat-Puffer werden 5 g Norit A zugegeben und damit gemischt. Diese Mischung bleibt eine Nacht lang stehen. Der Oberstand mit darin verbliebenen Charcoalpartikeln (= fines) wird abgesaugt, der Rest in 100 ml frischem Puffer resuspendiert. 0,2 ml dieser Suspension werden mit 0,2 ml Serum gut gemischt und 30 min. bei Raumtemperatur stehengelassen, dann 10 min. bei $2,5 \times 10^3 g$ zentrifugiert. Aus einem Aliquot des Oberstandes wird die Radioaktivität gemessen und daraus die Menge des gebundenen radioaktiven Steroides errechnet.

Mit der Methode nach Heyns konnten 79 % der Steroide entfernt werden und mit der nach Rudd nur 52 %; deshalb wurde im folgenden mit einem nach Heyns et al. behandeltem Serum gearbeitet und daraus der SHBG-Index bestimmt.

Der SHBG-Index ist nach teilweiser Entfernung endogener Steroide um 5-9 % höher. Andererseits läßt sich erst bei Zugabe von sehr großen Mengen an Steroiden (z.B. Testosteron ab ca. 10 ng zu 100 µl Serum, siehe 2.2.3.) eine Änderung der prozentualen Tracerbindung erkennen.

2.2.2.6. Verminderung der unspezifischen Bindung

Um die unspezifische Bindung zu vermindern, wurde als letzter Versuchsschritt die Probe nachgewaschen. Nach der ersten Zentrifugation und dem Absaugen des Oberstandes wurde 1 ml Phosphatpuffer zugegeben, daraufhin wieder zentrifugiert und abgesaugt.

2.2.2.7. Endgültige Methode

Der endgültige Ansatz eines Versuches sah so aus:

Jede Probe wurde als Doppelwert angesetzt

50 µl Serum (bzw. 4 %ige Albuminlösung für die unspezifische Bindung).

+ 300 µl Con A

20 min. Schütteln bei Raumtemperatur

Zugabe von 1 ml Tracer (DHT-Tracer mit ca. 8.000 cpm) mit 0,2 µg/ml Cortisol

1 Stunde Schütteln bei Raumtemperatur

5 min. Zentrifugieren bei 4.000 U/min.

Oberstand absaugen und verwerfen

Waschen durch Zugabe von 1 ml 0,01 M Phosphatpuffer

5 min. Zentrifugieren bei 4.000 U/min.

Oberstand absaugen

Nach Zugabe von 3 ml Unisolve-Szintillationsflüssigkeit wurden die Röhrchen verschlossen, gut durchgemischt und vor dem Zählen 1/2 Stunde bei 4°C kühlgestellt.

2.2.2.8. Berechnung des SHBG-Index

Benötigt wird zur Berechnung des SHBG-Indexes die Gesamtaktivität (T) der zu einer Probe zugegebenen Tracermenge und der Anteil der SHBG-gebundenen Aktivität der Probe. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\frac{P - N}{T} \times 100 \% = I$$

Dabei bedeutet:

T = Gesamtaktivität der Probe in cpm

P = Gebundene Aktivität der Probe in cpm

N = Unspezifische Bindung in cpm

I = SHBG-Index in %

2.2.3. Scatchard Plot

Mit Hilfe des Scatchard Plots kann durch die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes die Assoziationskonstante und die maximale Bindungskapazität eines Proteins für einen Liganden bestimmt werden (7).

2.2.3.1. Prinzip, Herleitung und Auswertung des Scatchard Plots

Zu jeweils gleichen Mengen des zu bestimmenden Proteins werden konstante Mengen eines radioaktiv markierten Liganden und steigende Mengen des entsprechenden "kalten" Liganden gegeben. Der

radioaktive und der kalte Ligand assoziieren sich - da dieser Prozeß sich als Gleichgewichtsreaktion abspielt - dem Verhältnis ihrer Konzentration entsprechend an das Protein, wobei der kalte Ligand mit ansteigender Konzentration den radioaktiven aus den Bindungsstellen des Proteins verdrängt. Nach Einstellung des Gleichgewichtes werden der an das Protein gebundene (Bound-Fraktion) und der freie Teil des Liganden (Free-Fraktion) getrennt. Damit kann das Verhältnis Bound/Free für jede Ligandenkonzentration durch Messung der Radioaktivität einer Fraktion bestimmt werden, und zwar nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Bound} - N}{\text{Free}} = K \times q - K \times \frac{\text{Bound} - N}{T} \times (L + L^*)$$

Dabei bedeutet:

Bound = Proteingebundener Anteil des Liganden

Free = Freier Anteil des Liganden

N = Unspezifische Bindung

T = Zugegebene Tracer-Gesamtaktivität

q = Gesamtes Bindungsprotein

L = Konzentration des eingesetzten kalten Liganden

L* = Konzentration des radioaktiven Liganden

K = Assoziationskonstante

Dabei sind die Werte L, L* und T bekannt, Bound und Free ergeben sich aus dem jeweiligen Versuch. Das unbekannte q spielt keine Rolle, solange es konstant gehalten wird (d.h. solange bei einer Versuchsreihe das gleiche Serum verwendet wird), da es dann nicht

in die Berechnung der Assoziationskonstanten K mit eingeht. Diese ist die einzige Unbekannte in dieser Gleichung. Sie ergibt sich, wenn Bound/Free als Ordinate gegen Bound/T x (L + L^{*}) als Abszisse aufgetragen wird, als Steigung der Geraden (6).

Diese Berechnungen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms durchgeführt (25): Bound/Free wurde als Ordinate ausgedruckt, die molare Konzentration des gebundenen Liganden (Bound/T x (L + L^{*})) als Abszisse; außerdem wurde die Steigung der Geraden (= Assoziationskonstante K), ihr Schnittpunkt mit der Abszisse (= maximale Bindungskapazität) und die Regression berechnet.

Abbildung 7 zeigt den "Computerausdruck" des Ergebnisses eines Scatchard Plots.

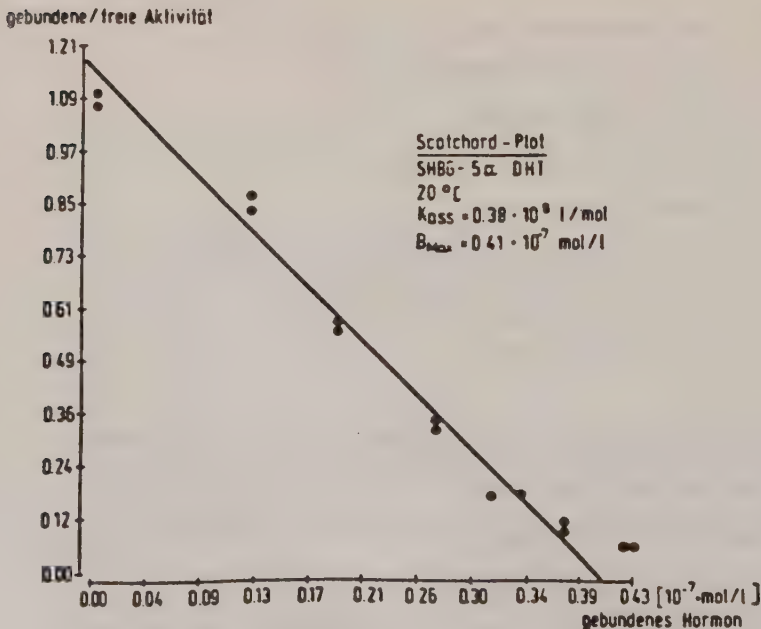


Abb. 7: Scatchard Plot

1. Seite des Computerausdruckes

2.2.3.2. Der diskordante Tracer

Bei der Bestimmung der Assoziationskonstanten mehrerer verschiedener Steroidhormone zum SHBG ergibt sich die Schwierigkeit, daß nicht alle gewünschten Steroide als ^3H -Tracer erhältlich sind oder daß deren Affinität zum Protein so gering ist (z.B. Androstendion siehe 2.2.3.3.4), daß sehr große Mengen an Radioaktivität benötigt würden, um überhaupt eine spezifische Bindung messen zu können.

Nach dem Prinzip des diskordanten Tracers (8) würde dagegen z.B. bei Bestimmung der Assoziationskonstanten des Testosterons zur Probe kaltes Testosteron und radioaktiv markiertes DHT als Tracer zugegeben. Mit dieser Methode kann allerdings nur ein Näherungswert für die wirklichen Assoziationskonstanten gewonnen werden. Die Bestätigung dieses Prinzips kann man erhalten durch Vergleich der mit diskordantem und konkordantem Tracer gewonnenen Assoziationskonstanten (siehe 2.2.3.3.4.).

2.2.3.3. Vorversuche

2.2.3.3.1. Durchführung des Scatchard Plots

Für den Scatchard Plot werden von jedem Serum sieben Proben jeweils als Doppelwert angesetzt. Der Versuchsaufbau entspricht dem zur Messung des SHBG-Indexes (siehe 2.2.2.7.), nur wird nach der

ersten 20-minütigen Inkubation außer DHT-Tracer und Cortisol zu jeder der sieben Proben 100 μ l einer entsprechenden Verdünnungsreihe von kaltem DHT (oder einem entsprechenden anderen Steroid) zugegeben. Die zugegebenen Mengen an kaltem DHT müssen in einem Bereich liegen, wo einerseits die Verdrängung des radioaktiven Hormons gerade beginnt, andererseits bereits alle Bindungsstellen von kaltem Hormon besetzt sind (= Countzahl nahe der unspezifischen Bindung N). Aus einer geometrischen Verdünnungsreihe erwies sich für Männer- und Frauenserum der Bereich von 1,95 - 62,5 ng/Probe, für Schwangerenserum der Bereich von 7,8 - 250 ng/Probe als zweckmäßig.

2.2.3.3.2. Einfluß verschiedener Versuchsbedingungen

Um den Einfluß verschiedener Faktoren auf Assoziationskonstante und Bindungskapazität zu prüfen, wurden vier vergleichende Versuche durchgeführt.

- 1) Ein Versuchsansatz mit charcoalbehandeltem (siehe 2.2.2.5.) Serum, also in Abwesenheit endogener Steroide
- 2) Ein Versuchsansatz mit Serum, aus dem das Albumin ausgewaschen wurde (siehe 2.2.2.5.) und somit als Bindungsproteine nur noch die Glykoproteine SHBG und CBG in Frage kamen

- 3) Ein Ansatz bei 37° C Inkubationstemperatur
- 4) Ein Ansatz mit Serum, aus dem Albumin und endogene Steroide entfernt worden waren, bei einer Inkubationstemperatur von 37°C (nach B.C.Nisula, 19)

Als Vergleich dienten die Versuche unter Normalbedingungen (siehe 2.2.3.3.1.).

Tabelle 1 zeigt, daß sich, außer einer geringen Erniedrigung der Assoziationskonstanten bei 37°C, weder die Assoziationskonstante noch die maximale Bindungskapazität bei einem der Versuche wesentlich verändern.

	$K_{Ass} (10^6 \text{ l/mol})$			$B_{Max} (\text{ nmol/l})$		
	Mann	Frau	Schwangere	Mann	Frau	Schwangere
20°C	34 ± 5	34 ± 6	5 ± 1	46 ± 11	80 ± 17	490 ± 15
37°C	15	24	2,5	52	75	710
Serum mit Charcoal gestrippt 20°C	46	23	4,5	56	72	750
Glycoproteine 20°C	45	39	8,6	59	72	620
Glycoproteine mit Charc. gestr. 37°C (nach B.C.Nisula)	25	18	3	34	61	600

Tab. 1: Einfluß verschiedener Versuchsbedingungen auf das Ergebnis des Scatchard Plots

2.2.3.3.3. Variation der SHBG-Konzentration

Im Schwangerenserum liegen wesentlich höhere SHBG-Konzentrationen vor als in anderen Seren. Um herauszufinden, ob starke Konzentrationsschwankungen etwas am Ergebnis des Scatchard Plots ändern, wurden bei einem Scatchard Plot verschiedene Verdünnungsstufen eines Schwangerenserums eingesetzt.

Tab. 2: Assoziationskonstante ($=K_{ASS}$) und maximale Bindungskapazität ($=B_{Max}$) bei verschiedenen Serumkonzentrationen eines Schwangerenserums

Serummenge/Probe	$K_{ASS}(10^6/l/mol)$	$B_{Max}(nmol/l)$
1 u $\bar{l}$	$0,9 \times 10^6$	$7,7 \times 10^{-7}$
5 u $\bar{l}$	$3,1 \times 10^6$	$6,9 \times 10^{-7}$
20 u $\bar{l}$	$3,8 \times 10^6$	$7,0 \times 10^{-7}$
50 u $\bar{l}$	$3,7 \times 10^6$	$6,4 \times 10^{-7}$
100 u $\bar{l}$	$4,9 \times 10^6$	$4,9 \times 10^{-7}$

Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, daß erst bei sehr niedriger Serum- und damit SHBG-Konzentration die Messung der Assoziationskonstanten falsch niedrig wird.

2.2.3.3.4. Vergleich von Versuchen mit konkordantem und diskordantem Tracer

Wie schon erwähnt (2.2.3.2.), kann eine mit diskordantem Tracer gemessene Assoziationskonstante der wirklichen nur angenähert sein. Um die Größenordnung dieses Unterschiedes zu sehen, wurde bei einem Steroid, dem Testosteron, jeweils ein Scatchard Plot mit konkordantem Testosteron-Tracer und mit diskordantem DHT-Tracer durchgeführt.

Tab. 3: Vergleich von Versuchen mit konkordantem und diskordantem Tracer

Der Versuch wurde mit Testosteron durchgeführt, der diskordante Tracer war DHT-Tracer

	konkordanter Tracer	diskordanter Tracer	<u>konkordanter</u> Tracer diskordanter
	Assoziationskonstante (1/mol)		Faktor
Mann	$1,5 \times 10^7$	$0,62 \times 10^7$	2,4
Frau	$1,3 \times 10^7$	$0,84 \times 10^7$	1,5
Schwangere	$0,42 \times 10^7$	$0,15 \times 10^7$	2,8
	maximale Bindungskapazität (mol/l)		
Mann	$0,27 \times 10^{-7}$	$0,17 \times 10^{-6}$	
Frau	$0,59 \times 10^{-7}$	$0,18 \times 10^{-6}$	
Schwangere	$4,5 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$	

Tabelle 3 zeigt, daß beim diskordanten Tracer die Assoziationskonstanten um den Faktor 1,5 bis 2,8 niedriger sind.

Bei Androstendion, 17-Hydroxy-Progesteron und Dihydroepiandrosteron wurde vom konkordanten Tracer so wenig gebunden, daß sehr hohe Tracerkonzentrationen erforderlich gewesen wären. Deshalb wurde hier auf die Messung mit konkordantem Tracer verzichtet.

3. ERGEBNISSE

3.1. SHBG-Index

3.1.1. Qualitätskontrolle

Der Variationskoeffizient beschreibt die Präzision einer Methode. Er ist definiert als die Standardabweichung in Prozent des Mittelwertes mehrerer Bestimmungen. Innerhalb einer Testserie wird er Intraassay-Variationskoeffizient genannt und zwischen verschiedenen Testserien Interassay-Variationskoeffizient. Für den Intraassay-Variationskoeffizienten wurde im gleichen Versuchsansatz der SHBG-Index von zwanzig Proben des gleichen Serums gemessen; für den Interassay-Variationskoeffizienten wurde bei jedem Versuchsansatz ein Kontrollserum mitbestimmt.

Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 4,4% bei $n=20$ und einem SHBG-Index $\bar{x} = 61,0 \pm 2,7$ %. Der Interassay-Variationskoeffizient betrug mit einem Schwangerenpoolserum als Kontrollserum 6,8 % bei $n=27$ und $\bar{x} = 60,4 \pm 4,1$ %, mit einem Poolserum von Normalpersonen 3,9 % bei $n=13$ und $\bar{x} = 60,8 \pm 2,4$ %.

3.1.2. Klinische Ergebnisse

3.1.2.1. Normalkollektiv

Um Abweichungen vom Normalen feststellen zu können, mußte zuerst ein Normalkollektiv erstellt werden. Dazu wurde der SHBG-Index von 28 klinisch gesunden Männern, ebenso vielen Frauen, von 10 männlichen und 10 weiblichen Kindern sowie von 22 Schwangeren bestimmt. Der SHBG-Index der Männer lag bei $48,4 \pm 7,7\%$, der der Frauen bei $62,9 \pm 2,5\%$, der der Jungen bei $58,5 \pm 5,7\%$, der der Mädchen bei $61,5 \pm 4,8\%$ (Abb. 10). Der durchschnittliche SHBG-Index der Schwangeren betrug $70,5 \pm 2,2\%$. Der SHBG-Gehalt des Serums ist bei Frauen also wesentlich höher als bei Männern - was von vielen Autoren bestätigt wird (3, 11, 13, 19) -, bei Schwangeren nochmals höher als bei nicht schwangeren Frauen, während sowohl der von Jungen als auch der von Mädchen sich nicht davon unterscheidet. Im Verlauf eines Monats schwankten die SHBG-Werte von vier Frauen zwar bis zu 8%, jedoch standen diese Schwankungen in keiner erkennbaren Korrelation zum Monatszyklus (Abb. 8), was auch in der Literatur bestätigt wird (13, 21).

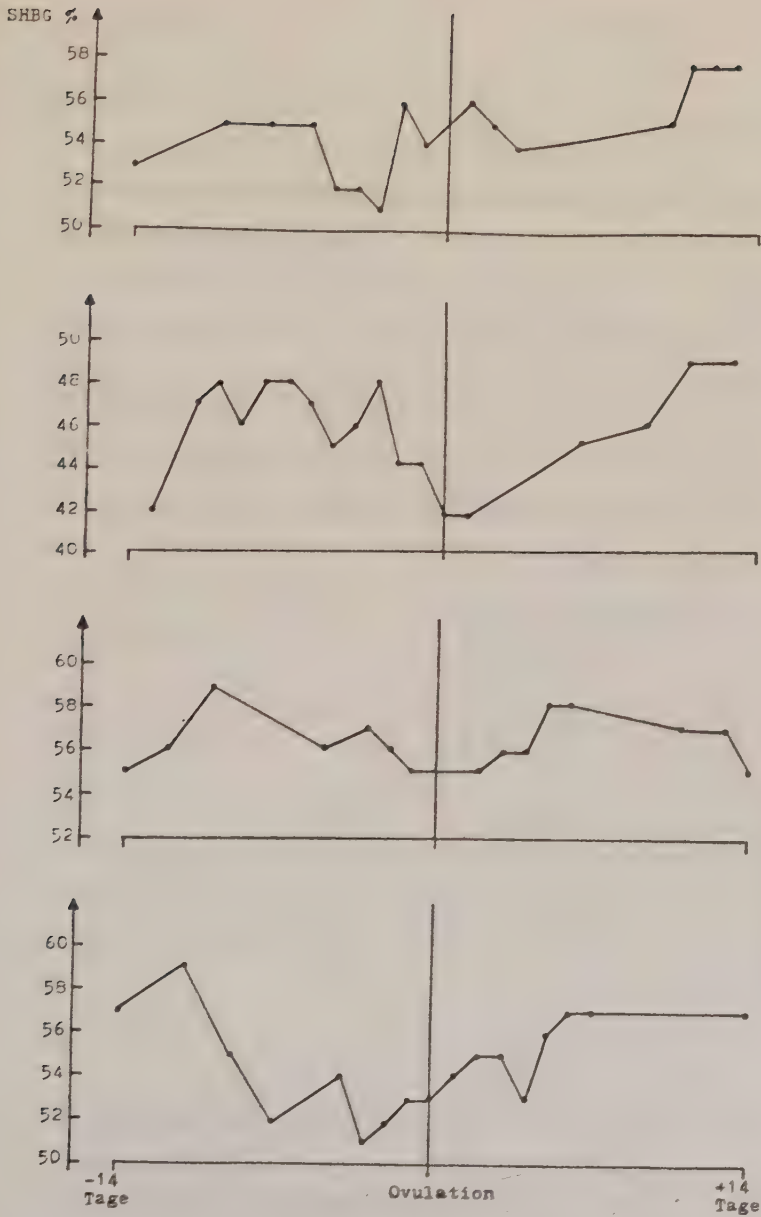


Abb. 8: SHBG-Index von 4 Frauen im Verlauf eines Monatszyklus

3.1.2.2. Patienten

Hirsutismus

Die Seren von 48 Patientinnen mit Hirsutismus wurden auf ihren SHBG-Index untersucht. Es ergab sich, daß der Index im Mittel wesentlich niedriger lag als bei gesunden Frauen, nämlich bei $51,5 \pm 9,4\%$ bei großer Streubreite (Abb. 10). Der Testosteronspiegel (gemessen bei 35 Patientinnen) ist nur bei einigen dieser Frauen erhöht; auffallend aber ist, daß bei vielen mit normalem Testosteronspiegel der SHBG-Index erniedrigt und somit der freie, biologisch aktive Testosteronanteil erhöht ist (26) (Abb. 9).

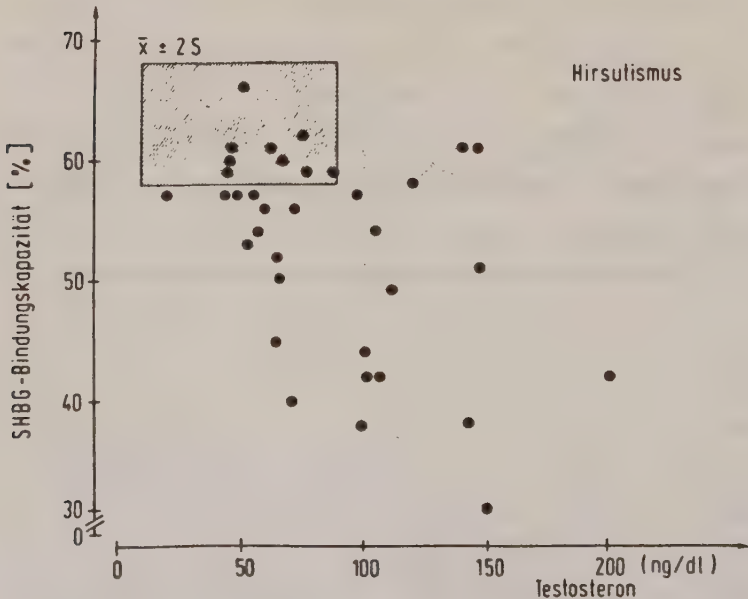


Abb. 9: SHBG-Index und Testosteronspiegel von 35 hirsuten
Frauen

Leberzirrhose

Der SHBG-Index von 7 Männern mit Leberzirrhose war mit $62,6 \pm 4,8\%$ gegenüber Normalpersonen deutlich erhöht, der von zwei zur Verfügung stehenden Frauenserien wich nur geringfügig von dem Normalkollektives ab (Abb. 10).

Morbus Addison

Der durchschnittliche SHBG-Index von neun Männern mit Morbus Addison betrug $54,3 \pm 4,8\%$. Dies bedeutet keine signifikante Abweichung gegenüber unserem Normalkollektiv ($48,4 \pm 7,7\%$). Zehn weibliche Patienten zeigen jedoch mit einem Index von $49,1 \pm 5,9\%$ gegenüber Normalpersonen ($62,9 \pm 2,5\%$) eine deutliche Erniedrigung (Abb. 10).

Hyperprolaktinämie

Bei 16 Männern und 24 Frauen mit einer Hyperprolaktinämie von 700 - 200.000 $\mu\text{E/ml}$ konnte mit $52,8 \pm 8,7\%$ bzw. $56,8 \pm 7,2\%$ keine deutliche Abweichung des SHBG-Indexes gegenüber Normalpersonen festgestellt werden (Abb.10).

Hypogonadismus

Hier wurden nur hypogonade Patienten mit einem unter 300 ng/100 ml erniedrigten Testosteronspiegel untersucht. Der SHBG-Spiegel dieser 20 Patienten war mit $51,5 \pm 7,3\%$ praktisch nicht verändert (normal $48,4 \pm 7,7\%$).

Gynäkomastie

Die 23 Patienten mit Gynäkomastie hatten bei zumeist normalem, in Einzelfällen leicht erniedrigtem Testosteron, einen SHBG-Index von $49,7 \pm 5,1\%$ (Abb. 10). Dieser Index entspricht dem des Normalkollektivs.

Hyper- und Hypothyreose

Sechs männliche Patienten mit Hyperthyreose zeigten mit $55,8 \pm 8,0\%$ eine leichte Erhöhung des SHBG-Indexes, während vier Patienten mit Hypothyreose mit $47,2 \pm 11,8\%$ ziemlich genau dem Durchschnitt entsprachen. Auch sechs hyperthyreote Patientinnen zeigten mit $65,7 \pm 6,3\%$ eine geringe Erhöhung des SHBG-Indexes, während acht hypothyreote Patientinnen mit $54,8 \pm 7\%$ deutlich unter dem SHBG-Index des Normalkollektivs lagen (Abb. 10).

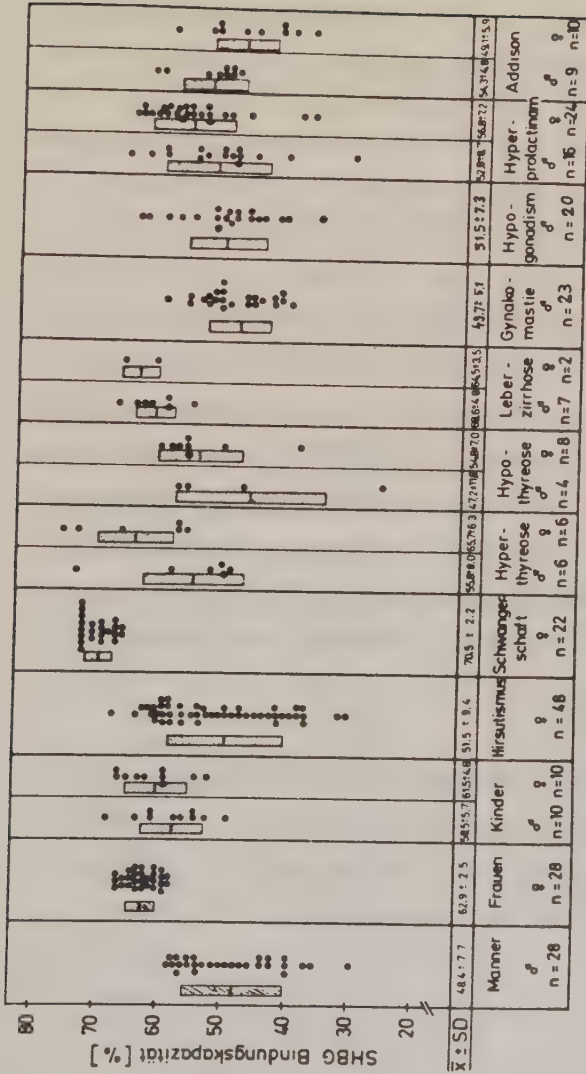


Abb. 10: SHBG-Index von Männern, Frauen und Kindern eines Normalkollektivs im Vergleich zum SHBG-Index von Schwangeren und Patienten mit Hirsutismus, Leberzirrhose, Hyper- und Hypothyreose, Gynäkomastie, Hypogonadismus, Hyperprolaktinämie und M.Addison.

3.2. Scatchard Plot

3.2.1. Assoziationskonstante und Bindungskapazität für DHT und einige andere Steroide

Hier wurde für alle Versuche Poolserum verwendet. Erwartungsgemäß ergab sich, daß die SHBG-Bindungskapazität (die ja mit dem SHBG-Index korreliert) für DHT beim Mann ($0,46 \times 10^{-7} \text{M}, \pm 0,11$) geringer ist als bei der Frau ($0,79 \times 10^{-7} \text{M}, \pm 0,17$). Weit höher als diese beiden lag die Bindungskapazität der Schwangeren ($4,9 \times 10^{-7} \text{M}, \pm 1,5$). Die Assoziationskonstante im Schwangerenserum ($0,49 \times 10^7 \text{M}^{-1}, \pm 0,13$) lag dagegen weit unter der von Mann ($3,4 \times 10^7 \text{M}^{-1}, \pm 0,47$) und Frau ($3,4 \times 10^7 \text{M}^{-1}, \pm 0,57$), die untereinander gleich waren. Die unterschiedlichen Bindungskapazitäten bei Mann, Frau und Schwangerer und die niedrigere Assoziationskonstante der Schwangeren trafen ebenso für alle anderen gemessenen Androgene zu, nicht aber für $17\alpha\text{-OH-Progesteron}$ und Östradiol (Tab. 4).

Aus Tab. 4 ist auch zu ersehen, daß die Steroide mit einer $17\beta\text{-Hydroxylgruppe}$ (DHT, Testosteron, Östradiol) eine höhere Affinität zum SHBG aufweisen als die Steroide ohne diese Konfiguration (DHEA, Androstendion, $17\alpha\text{-OH-Progesteron}$).

Tab. 4: Assoziationskonstante und Bindungskapazität
des SHBG für verschiedene Steroide

Die Versuche für die mit *) gekennzeichneten Steroide wurden
mit diskordantem DHT-Tracer (siehe 2.2.3.2.) durchgeführt.
1 = Schwangere, 2 = Frau, 3 = Mann

		Assoziationskonstante (M^{-1})	Bindungskapazität (M)
DHT	1	$0,49 \times 10^7 + 0,13$	$4,9 \times 10^{-7} + 1,5$
	2	$3,4 \times 10^7 + 0,57$	$0,79 \times 10^{-7} + 0,17$
	3	$3,4 \times 10^7 + 0,47$	$0,46 \times 10^{-7} + 0,11$
Testosteron	1	$0,42 \times 10^7$	$4,5 \times 10^{-7}$
	2	$1,3 \times 10^7$	$0,59 \times 10^{-7}$
	3	$1,5 \times 10^7$	$0,27 \times 10^{-7}$
Östradiol*)	1	$1,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^{-5}$
	2	$9,0 \times 10^5$	$0,2 \times 10^{-5}$
	3	$7,0 \times 10^5$	$0,15 \times 10^{-5}$
DHEA*)	1	$0,56 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-5}$
	2	$3,8 \times 10^5$	$0,53 \times 10^{-5}$
	3	$3,2 \times 10^5$	$0,35 \times 10^{-5}$
Andro- stendion *)	1	$0,26 \times 10^5$	$7,9 \times 10^{-5}$
	2	$1,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-5}$
	3	$1,2 \times 10^5$	$0,87 \times 10^{-5}$
17-OH-Pro- gesteron *)	1	$4,7 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-5}$
	2	$4,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^{-5}$
	3	$4,5 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-5}$

3.3.2. SHBG-Assoziationskonstanten bei verschiedenen Patienten

Aus dem Krankengut von Patienten mit Hirsutismus, Gynäkomastie und Hypogonadismus wurde bei je einem Patienten mit der entsprechenden klinischen Diagnose die Assoziationskonstante für DHT gemessen. Diese betrug bei der Hirsuten (SHBG-Index 60%) $3,2 \times 10^7 \text{M}^{-1}$, bei dem Hypogonaden (Testosteron 373 ng %, SHBG-Index 49%) $2,4 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ und bei dem Mann mit Gynäkomastie (Testosteron 160 ng%, SHBG-Index 47%) $3,9 \times 10^7 \text{M}^{-1}$. Es bestand also kein deutlicher Unterschied zur Assoziationskonstante von Gesunden (Tab. 5).

Tab. 5: Assoziationskonstanten für DHT

von einer Patientin mit Hirsutismus, einem Patienten mit Gynäkomastie und einem mit Hypogonadismus im Vergleich zu Normalpersonen

	$K_{\text{ASS}} (10^6 \text{l/mol})$	$B_{\text{Max}} (\text{nmol/l})$
Männer (n=2)	34	46
Frauen (n=2)	34	80
Schwangere (n=5)	5	490
Hirsutismus (n=1)	32	48
Gynäkomastie (n=1)	26	41
Hypogonadismus (n=1)	39	27

4. DISKUSSION

Die Methode der Adsorption an Con A-Sepharose wurde in dieser Arbeit verwendet, wegen ihrer einfachen Durchführung bei hoher Reproduzierbarkeit, dem relativ geringen Arbeitsaufwand, großer Kapazität, der Möglichkeit der Differenzierung zwischen glykoprotein- und albumingebundenem Hormon und dem relativ niedrigen Kosten- und Geräteaufwand.

Im Vergleich dazu haben andere indirekte Methoden einige Nachteile:

Bei der Gleichgewichtsdialyse (8, 32) wird in eine von zwei Kammern, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind, eine Standardlösung von tritiummarkiertem Testosteron eingebracht, in die andere die zu messende Serumprobe. Da die Diffusion durch die Membran nur für das freie Testosteron möglich ist, kann dann aus der Differenz der in den beiden Kammern gemessenen Radioaktivität der Anteil des proteingebundenen Testosteron errechnet werden. Bei der Charcoal-Methode (10, 24) wird Serum mit tritiummarkiertem Testosteron versetzt und dann der freie Testosteronanteil an Charcoal (= Aktivkohle) adsorbiert. Aus dem Anteil der im Serum verbliebenen Radioaktivität kann wiederum der Anteil des proteingebundenen Testosteron errechnet werden.

Beide Methoden haben den Nachteil, daß nicht differenziert werden kann zwischen dem an SHBG und dem an andere Proteine gebundenen Hormon.

Die Ammonium-Sulfat-Präzipitation (23) erfordert höheren Arbeitsaufwand und sehr präzises Arbeiten. Dabei wird das in der Serum-Probe enthaltene SHBG mit ^3H -DHT abgesättigt; der SHBG-Steroid-Komplex muß dann durch Zugabe einer genau definierten Ammonium-Sulfat-Lösung präzipitiert werden; aus der Radioaktivität des Präzipitates kann der SHBG-Gehalt der Probe errechnet werden.

Bei der Elektrophorese-Methode wird die Plasma-Probe nach Inkubation mit ^3H -DHT über eine Gelplatte (z.B. Agar-Gel (4) oder Polyacrylamid-Gel (14)) elektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem Peak, der der SHBG-Fraktion mit dem spezifisch daran gebundenen DHT entspricht, kann bei Kenntnis der spezifischen Aktivität des eingesetzten DHT-Tracers die Bindungskapazität des SHBG errechnet werden.

Die Auftrennung der Serum-Probe erfolgt bei den Säulenchromatographien - wiederum nach Inkubation der Probe mit ^3H -DHT oder ^3H -Testosteron - durch Auftragen auf gel-gefüllte Säulen (z.B. DEAE-Cellulose (9), Sephadex G50 fine (2)) und nachfolgende Elution mit entsprechenden Puffern.

Diese chromatographischen Methoden haben eine geringe Kapazität und erfordern einen hohen Arbeitsaufwand. Dadurch eignen sie sich nicht gut für eine routinemäßige Anwendung, sondern nur für spezielle Anwendungsbereiche, wie z.B. die Isolierung des SHBG (28).

Die Optimierung der Methode von Nisula (19) zielte auf weitere Vereinfachung ab (27):

Die Verkürzung der Con A-Serum-Inkubationszeit von 30 auf 20 min. wurde vorgenommen, da nach unseren Vorversuchen (2.2.2.3.) bereits bei 15 min. Inkubationszeit in der Kinetik ein Plateau erreicht war. Auf das Auswaschen des Albumins aus dem Serum wurde verzichtet, da einerseits die zwei dazu notwendigen Waschschriffe einen erheblichen Arbeitsmehraufwand bedeuten, andererseits der dadurch bedingte Fehler nicht sehr groß ist. Auch auf die Entfernung der endogenen Steroide aus dem Serum durch Charcoal wurde verzichtet, obwohl der SHBG-Index dabei 5-9% höher lag. Andererseits nämlich ließ sich erst bei Zugabe von sehr großen Mengen an Steroiden eine Änderung der prozentualen Tracerbindung erkennen, so daß anzunehmen ist, daß die Charcoal-Methode außer der Entfernung der Steroide aus dem Serum noch andere Effekte verursacht. Die von Nisula empfohlene Cortisolzugabe zur Absättigung des CBG wurde aus theoretischen Überlegungen beibehalten, obwohl sich bei unseren Versuchen dabei kein Effekt feststellen ließ. Statt ^3H -Testosteron-Tracer wurde ^3H -DHT-Tracer wegen seiner größeren Affinität zum SHBG verwendet und die Tracercountzahl von 30 - 50.000 cpm/Probe bei Nisula wurde auf ca. 8.000 cpm/Probe reduziert. Statt der Inkubation im 37°C-Wasserbad mit Schütteln in 5 - 10 minütigen Abständen und anschließendem Stehenlassen für 1 Stunde zur Sedimentierung des Gels wurden die Proben bei Raumtemperatur im Evaporator unter ständigem Schütteln inkubiert und dann 5 Minuten bei 4.000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Hier wurde noch ein zusätzlicher Waschschrift eingeführt, um die unspezifische

Bindung zu vermindern.

Die Berechnung wurde stark vereinfacht: Es wurde nicht die absolute Menge des SHBG, sondern der "SHBG-Index" ermittelt, das ist die gebundene Radioaktivität im Sediment in Prozent der zugegebenen Gesamtaktivität.

Dafür genügte der Ansatz einer Probe für jedes Serum, während für die Ermittlung der maximalen Bindungskapazität (äquimolar mit dem SHBG-Gehalt) jeweils ein Scatchard Plot mit 6 - 7 Proben nötig ist. Der SHBG-Index genügt für den Vergleich von beliebigen Patientenseren gegenüber einem mit der gleichen Methode ermittelten Normalkollektiv; ebenso ist er z.B. geeignet für Erfolgskontrollen bei SHBG-Präparation und -Extraktion (28).

Die Anwendung kann auch bei Bedarf mit Hilfe des Scatchard Plots auf die Ermittlung der maximalen SHBG-Bindungskapazität und der Assoziationskonstanten erweitert werden. Die auf diese Art ermittelte maximale Bindungskapazität für DHT und Testosteron stimmte gut mit Angaben aus der Literatur (3, 4, 7, 10, 11, 13, 19, 20, 33) überein. Die Assoziationskonstante allerdings lag um den Faktor 10 unter der von Rudd et al. (24) und um den Faktor 100 unter der von Dunn et al. (5) und von Nisula (19) angegebenen. Diese niedrige Assoziationskonstante ist vor allem im Vergleich zu Nisula und zu Dunn et al., die beide ebenfalls mit der Methode der Adsorption an Con A-Sepharose arbeiteten, aus der Methodik nicht zu erklären; auch ein Versuch, bei dem die Versuchsparameter wieder der Methode Nisulas entsprachen, erzielte keir.

anderes Ergebnis. Die Assoziationskonstante von Mann und Frau wies bei uns keinen Unterschied auf, wie es O'Connor et al. (20) bestätigen, während Nisula beim Mann eine signifikant höhere Assoziationskonstante als bei der Frau fand .

Die Assoziationskonstante von Schwangeren (gemessen aus Poolserum) dagegen lag um den Faktor 6 niedriger als die von normalen Frauen; bei Rudd et al. (24) liegt diese um den Faktor 2 niedriger. Dieser Unterschied in der Assoziationskonstante des gleichen Proteins bei Schwangeren und Normalpersonen wäre zu erklären durch eine Mikroheterogenität des SHBG oder durch Interaktionen mit anderen erhöhten Bindungsproteinen und Hormonen.

Auch bei der Bestimmung anderer Steroide (Östradiol, Dihydroepiandrosteron, Androstendion, 17α -Hydroxy-Progesteron) mit einem diskordanten DHT-Tracer lagen alle Assoziationskonstanten um ca. den Faktor 100 niedriger als z.B. von Dunn et al. angegeben, während ihre Relationen untereinander übereinstimmen.

Die Steroide mit einer 17β -Hydroxy-Konfiguration (DHT, Testosteron, Östradiol) haben, wie auch in der Literatur beschrieben (17), eine höhere Affinität zu SHBG als Steroide ohne diese Konfiguration (s. Tab. 4).

Der SHBG-Index von Normalpersonen lag (ebenso wie die maximale Bindungskapazität) bei Frauen höher als bei Männern - am höchsten bei schwangeren Frauen - und der von Kindern beiderlei

Geschlechts ebenso hoch wie der von Frauen (siehe auch 13, 16, 24). Der SHBG-Index von hirsuten Frauen war im Mittel deutlich erniedrigt, was von zahlreichen anderen Autoren bestätigt wird (9, 13, 16, 24, 27); die Streuung der Werte war dabei wesentlich größer als normal. Der SHBG-Index bei Patienten mit Leberzirrhose war dagegen deutlich erhöht (siehe auch 16); zyklusabhängige Schwankungen während des normalen Monatszyklus einer Frau konnten nicht festgestellt werden (13, 21). Bei Patienten mit Gynäkomastie und Hypogonadismus fanden wir keine Abweichung der Werte vom Normalkollektiv, während einige Autoren hier erhöhte SHBG-Spiegel beschreiben (16, 24, 33). Dies könnte vielleicht an der Auswahl der Patienten liegen; Rudd et al. (24) untersuchten z.B. nur hypogonadotrope hypogonade Patienten. Auch bei Hyperprolaktinämie fanden wir Normalwerte im Gegensatz zu Vermeulen et al. (31), die eine deutliche Erniedrigung des SHBG-Spiegels bei Prolaktinomen feststellten. Das von uns geprüfte Patientenkollektiv umfaßte allerdings Patienten mit Prolaktinspiegeln von 700 - 200.000 $\mu\text{E/ml}$ (normal bis 500 $\mu\text{E/ml}$), während die niedrigsten Prolaktinspiegel der von Vermeulen et al. untersuchten Patienten bei den zehnfachen Normalwerten lagen. Bei neun Männern mit Morbus Addison war keine Abweichung vom Normalkollektiv festzustellen, während bei zehn Frauen eine deutliche Erniedrigung vorlag. In der Literatur konnte hierfür keine Bestätigung gefunden werden. Jeweils sechs männliche und sechs weibliche hyperthyreote Patienten zeigten einen im Durchschnitt leicht erhöhten SHBG-Index; die Anzahl der Patienten war allerdings gering und die Streubreite groß. Auch Mean et al. (16) geben aber bei hyperthyreoten Patien-

ten einen erhöhten SHBG-Spiegel an, bei hypothyreoten dagegen einen erniedrigten. Bei uns lagen acht hypothyreote weibliche Patienten ebenfalls deutlich unter dem Durchschnitt, während dies bei vier männlichen Patienten nicht der Fall war. Die Anzahl der Proben war allerdings zu gering, um aussagefähig zu sein.

Für die Messung von Schwangerenserum ist der SHBG-Index nur bedingt geeignet, da der SHBG-Gehalt von Schwangerenserum um ein Mehrfaches erhöht ist, die höchste erzielte prozentuale Tracerbindung aus methodischen Gründen aber bei ca. 75 % lag. Bei sehr hohen SHBG-Konzentrationen sinkt die prozentuale Tracerbindung sogar ab, da die Kapazität des Adsorptionsgels überschritten wird und das SHBG somit nicht im Sediment erscheint. Die Messung der SHBG-Indexes kann hier also nur sinnvoll sein unter Verdünnung des Serums, ist aber damit nur zum Vergleich von Seren, die unter derselben Verdünnung gemessen wurden, geeignet.

Die Ermittlung der Assoziationskonstanten und der maximalen Bindungskapazität durch den Scatchard Plot ist allerdings in einem bestimmten Bereich konzentrationsunabhängig. Erst bei hohen Verdünnungsstufen (siehe 2.2.3.3.3., Tab. 2) wird diese Bestimmung fehlerhaft.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es gibt zwar bereits einen Radioimmunoassay zur direkten Messung des SHBG, wegen der schwierigen und aufwendigen Reinigung und Isolierung des SHBG ist er bisher jedoch noch nicht zur routinemäßigen Anwendung geeignet (29). Die in dieser Arbeit verwendete Methode mißt das SHBG indirekt (19). Das im Serum vorhandene SHBG bindet tritiummarkiertes 5α -Dihydrotestosteron. Das SHBG mit dem daran gebundenen markierten 5α -Dihydrotestosteron wird an ein Gel, die Con A-Sepharose, adsorbiert und kann dann durch Zentrifugieren abgetrennt werden. Aus der Höhe der prozentualen Tracerbindung, dem "SHBG-Index", kann auf die relative Menge des in der Probe vorhandenen SHBG geschlossen werden. Der Intraassay-Variationskoeffizient der Methode betrug 4,4%, der Interassay-Variationskoeffizient für ein Kontrollserum 6,8%, für ein anderes 3,9%.

Der SHBG-Index von 28 gesunden Männern betrug $48,4 \pm 7,7\%$, der von 28 gesunden Frauen $62,9 \pm 2,5\%$ und der von 20 Kindern beiderlei Geschlechtes ungefähr so viel wie der der Frauen; der SHBG-Index von Schwangeren ist im unverdünnten Serum nicht relevant, da der SHBG-Gehalt des Serums um ein Mehrfaches gegenüber normalen Frauen erhöht ist.

Bei Frauen mit Hirsutismus, mit Morbus Addison (im Gegensatz zu Männern mit Morbus Addison) und mit Hypothyreose wurde ein deutlich erniedrigter, bei Männern mit Leberzirrhose ein deutlich

erhöhter SHBG-Index gefunden; bei Patienten mit Hyperprolaktinämie, Hypogonadismus und Gynäkomastie lag er im Normbereich. Bei Männern mit Hypothyreose und bei Männern und Frauen mit Hyperthyreose war die Abweichung vom Normalkollektiv zu gering, um bei der geringen Anzahl der Probanden aussagekräftig zu sein.

Beim Versuchansatz in Form eines Scatchard Plots wird durch Zugabe verschiedener Mengen des entsprechenden "kalten" Hormons das radioaktive Hormon kompetitiv vom SHBG verdrängt. Aus dem Ausmaß der Verdrängung kann mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes die maximale Bindungskapazität und die Assoziationskonstante des SHBG für das entsprechende Hormon bestimmt werden. Die Bindungskapazität betrug im Normalkollektiv für DHT bei Männern 46×10^{-9} Mol/l (= 1,34 μg %), bei Frauen 80×10^{-9} Mol/l (= 2,32 μg %). Die Assoziationskonstanten lagen für Frauen und Männer bei $3,4 \times 10^7 \text{M}^{-1}$, für Schwangere wesentlich niedriger bei $0,49 \times 10^7 \text{M}^{-1}$. Die Problematik hierbei war, daß die in der Literatur angegebenen Assoziationskonstanten meist um den Faktor 100 höher lagen; der Grund dafür konnte auch durch Prüfung des Versuchsansatzes mit Veränderung verschiedener Versuchparameter nicht geklärt werden. Die Methode sollte also für diesen Zweck nur mit Vorbehalt angewandt werden.

6. LITERATUR

1. ANDERSON D.C. Sex-Hormone-Binding Globulin, Clin. Endocrinol. 3, 38-40, 1984
2. BRAUN J. Automatisierung der Bestimmung der Bindung von Cortisol an Serumproteine und des Gesamtcortisols im Serum (Competitive Proteinbindungsanalyse), Dissertation an der Universität München, 1984
3. CAPUTO M. Problemi metodologi inerenti al radiodosaggio della sex hormone binding globulin con DEAE cellulosa, Bol. Soc. Ital. Biol. Sper. 56 (14): 1485-1491, 1980
CROCI R.
CHIMINI G.
BIASSONI P.
BAGNASCO M.
4. CORVOL P.L. Physical Properties and Binding Capacity of Testosterone-Estradiol-Binding Globulin in Human Plasma, Determined by Polyacrylamide Gel Electrophoresis, J. Biol. Chem. 246, 3435-3443, 1971
CHRAMBACH A.
RODBARD D.
BARDIN C.W.
5. DUNN J.F. Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Both Testosterone - Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma, J. Clin. Endocrinology and Metabolism, Vol. 53, Nr. 1, 58-68, 1981
NISULA B.C.
RODBARD D.
6. FELDMANN H. Mathematical theory of radioimmunoassay
RODBARD D. In: ODELL W.D., DAUGHADAY W.H. (eds.), Principles of competitive protein-binding assays, J.B. LIPPINCOTT Comp., Philadelphia, 1971, 158
7. FRÖLICH M. Sex Hormone Binding Globulin: Binding Capacity and Studies on the Binding of Cyproterone Acetate and Other Steroids, Clinica Chimica Acta 87: 239-244, 1978
VAN SCHIE M.G.
BRAND E.C.
8. HANSLE W.O. Untersuchungen zur Bindung von Steroiden an das isolierte menschliche Corticosteroid-bindende-Globulin (CBG), Dissertation München 1980
9. HARMAN S.M. Rapid Measurement of an Index of Testosterone Binding to Serum Binding Globulin Using Ion Exchange Columns, J. Clin. Endocrinol. Metab. 45 (5): 953-959, 1978
DANNER R.L.
10. HEYNS W. Study of Steroid-Protein Binding by Means of Competitive Adsorption: Application to Cortisol Binding in Plasma, Clinica Chimica Acta 18: 361-370, 1967
VAN BAELEN H.
DE MOOR P.
11. HEYNS W. The Binding of 17 β -Hydroxy-5 α -Androstan-3-one to the Steroid Binding B-Globulin in Human Plasma, as Studied by Means of Ammonium Sulphate Precipitation, J. Steroids 18:6, 709-730, 1971
DE MOOR P.

12. IQBAL M. J.
FORD P.
JOHNSON M. W. Purification of Sex Hormone Binding Globulin, Using an Affinity Matrix in an Electrophoretic Cell System; FEBS Lett 87 (2), 235-238, 1978
13. KAWAGOE S.
HIROI M. A Simplified Method for Measuring the Binding Capacity of Sex Hormone Binding Globulin in Human Serum and its Clinical Application, Folia Endocrinol Jpn 56 (7): 933-944, 1980
14. KRIEG M.
ARNING C. Quantitative Determination of the Binding Capacity of the Sex Hormone Binding Globulin Using Agar Gel Electrophoresis, J Clin Chem Clin Biochem 16 (8): 429-34, 1978
15. LÜFFLER
PETRIDES
WEISS
HARPER Physiologische Chemie,
Springer-Verlag, 1979
16. MEAN F.
PELLATON M.
MAGRINI G. Study on the Binding of DHT, Testosterone and Estradiol with Sex Hormone Binding Globulin, Clin Chim Acta 80 (1): 171-180, 1978
17. MERCIER - BODARD C.
ALFSEN A.
BAULIEU E. E. Sex-Steroid Binding Plasma Protein, Acta Endocrinologica 64, Suppl. 147:204, 1970
18. MICKELSON K. E.
TELLER D. C.
PETRA P.H. Characterization of the Sex Steroid Binding Protein of Human Pregnancy Serum. Improvements in the Purification Procedure; Biochemistry 17: 1409-1415, 1978
19. NISULA B. C.
DUNN J. F. Measurement of the Testosterone Binding Parameters for Both Testosterone-Estradiol Binding Globulin and Albumin in Individual Serum Samples, Steroids 34 (7): 771-791, 1979
20. O'CONNOR S.
BAKER H. W. G.
DULMANIS A.
HUDSON B. The Measurement of Sex Steroid Binding Globulin by Differential Ammonium Sulphate Precipitation, Journal of Steroid Biochemistry 4: 331-339, 1973
21. OD Lind V.
ELAMSSON K.
EGLUND D. E.
VICTOR A.
JOHANSSON E.D.B. Effects of Oestradiol on Sex Hormone Binding Globulin, Acta Endocrinologica 101: 248-253, 1982
22. RATAJCZAK Th.
HÄHNEL R. An Assay for Sex Hormone Binding Globulin Based on Affinity Chromatography, Clinica Chimica Acta 73: 379-385, 1976
23. ROSNER W. A Simplified Method für the Quantitative Determination of Testosterone-Estradiol-Binding Globulin Activity in Human Plasma, J Clin Endocrinol Metab 34: 983-988, 1972

24. RUDD B. T. A Rapid Method for the Measurement of Sex Hormone Binding
DUIGNAN N. M. Globulin Capacity of Sera, Clinica Chimica Acta 55: L O N D
ON D. R. 165-178, 1974

25. STALLA G. K. Optimierung der radioimmunologischen Bestimmungsmethoden
von Cortisol und Calcitonin, Dissertation an der Univer-
sität München, 1980

26. STALLA G. K. Dehydroepiandrosteronsulfat und SHBG-Bindungskapazität
BÜCK M. bei Patientinnen mit Hirsutismus, Verh. Dtsch. Ges. Inn.
HARTWIMMER J. Med. 90: 1240-1242, 1984
MÖLLER O. A.

27. STALLA G. K. SHBG-Binding Capacity for the better quantification of
DOBMEIER M. disturbances of androgen secretion, Acta Endocrinol
MÖLLER O. A. (Kbh) 102, Suppl. 253: 60-61, 1983

28. STALLA G. K. Human Sex Hormone Binding Globulin (SHBG): Isolation
HARTWIMMER J. Characterization and Determination, Fresenius Z Anal
BÜCK M. Chem 317: 732, 1984
MÖLLER O. A.

29. STALLA G. K. Purification of Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)
KRASSNIGG F. from Human Serum, Fresenius Z Anal Chem 311: 458-459,
MÖLLER O. A. 1982

30. TRÄGER L. Steroidhormone, Springer-Verlag 1977

31. VERMEULEN A. Prolactinomas, Testosterone-Binding-Globulin and Androgen
ANDO S. Metabolism, Journal of Clinical Endocrinology and Meta-
VERDONCK L. bolism 54 (2): 409-412, 1982

32. VERMEULEN A. The Apparent Free Testosterone Concentration, an Index
STOICA T. of Androgenicity, J Clin Endocrinol Metab 33: 759, 1971
VERDONCK L.

33. VERMEULEN A. Capacity of the Testosterone Binding Globulin in Human
VERDONCK L. Plasma and Influence of Specific Binding of Testosterone
VAN DER STRAETEN M. on its Metabolic Clearance Rate, J Clin Endocrinol 29:
ORIE N. 1470-1480, 1969

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. Müller für die freundliche
Oberlassung des Themas danken, Herrn Dr. Günther Stalla für
die hilfreiche Betreuung der Arbeit und sämtlichen Mitarbei-
tern des Labors für ihre freundliche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name: Maria Böck

Geburtsdatum und -ort 10. März 1959 in 8950 Kaufbeuren

Konfession: Röm.-Kath.

Vater: Hubert Böck, Koch

Mutter: Mathilde Böck, geb. Ehrhardt, Hausfrau

Schulausbildung: 1965-1969 Volksschule Hirschzell-Kaufbeuren
1969-1978 Staatl. Gymnasium Kaufbeuren
Juni 1978 Abitur, Staatl. Gymnasium Kaufbeuren

Studium: Beginn Medizinstudium: Wintersemester 1978/79
Physikum: August 1980
1. Staatsexamen: August 1981
2. Staatsexamen: März 1984
3. Staatsexamen: Schriftl. Teil 10.04.1985
Mündl. Teil 02.05.1985

Das gesamte Medizinstudium wurde an der LMU in München absolviert.

Bisherige berufliche Tätigkeit: Seit 1.7.1985 Assistenzärztin für Chirurgie im Kreiskrankenhaus Fürstenzell.

